

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/35989 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/11306**

(22) Internationales Anmeldedatum:  
15. November 2000 (15.11.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:  
A-1927/99 16. November 1999 (16.11.1999) AT

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **IGENEON KREBS-IMMUNTHERAPIE FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSGES. MBH** [AT/AT]; Brunnerstrasse 59, A-1230 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **LOIBNER, Hans** [AT/AT]; Heimgasse 23, A-1238 Wien (AT). **ECKERT, Helmut** [CH/CH]; Hohe Strasse 167, CH-4104 Oberwil (CH). **HIMMLER, Gottfried** [AT/AT]; Colloredogasse 29, A-1180 Wien (AT).

(74) Anwalt: **VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title:** NOVEL USE OF ANTIBODIES AS VACCINES

(54) **Bezeichnung:** NEUE VERWENDUNG VON ANTIKÖRPERN ALS IMPFSTOFFE

**WO 01/35989 A2**

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of antibodies, which bind to antibodies for tumour-associated antigens and which are obtained from individual body fluids by immuno-affinity purification with specific ligands, for the production of individual, autologous, prophylactic or therapeutic vaccination against cancerous disease states. The ligands for immuno-affinity purification are antibodies or derivatives thereof, to tumour associated antigens. The invention further relates to pharmaceutical compositions, which comprise the antibodies produced by immuno-affinity purification, or the dendritic cells pulsed in-vitro by said antibodies.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird die Verwendung von Antikörpern, die an Antikörper gegen Tumorassoziierte Antigene binden und die aus individuellen Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung an spezifischen Liganden gewonnen werden, zur Herstellung einer Zusammensetzung zur individuellen, autologen prophylaktischen oder therapeutischen Vakzinierung gegen Krebserkrankungen. Die Liganden der Immunaffinitätsreinigung sind Antikörper oder deren Derivate, die gegen Tumorassoziierte Antigene gerichtet sind. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die die durch Immunaffinitätsreinigung erhaltenen Antikörper enthalten oder mit diesen in-vitro gepulste dendritische Zellen.

## NEUE VERWENDUNG VON ANTIKÖRPERN ALS IMPFSTOFFE

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von Antikörpern, die an Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene binden und die aus individuellen Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung an spezifischen Liganden gewonnen werden, zur Herstellung einer Zusammensetzung zur individuellen, autologen prophylaktischen oder therapeutischen Vakzinierung gegen Krebserkrankungen. Die Liganden der Immunaffinitätsreinigung sind Antikörper oder deren Derivate, die gegen ein oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, die die durch Immunaffinitätsreinigung erhaltenen Antikörper enthalten oder mit diesen in-vitro gepulste dendritische Zellen.

Das adaptive Immunsystem des Menschen besteht aus zwei wesentlichen Komponenten, der humoralen und der zellulären Immunität. Die adaptive Immunantwort beruht auf der clonalen Selektion von B- und T-Lymphozyten und erlaubt im Prinzip die Erkennung jedes beliebigen Antigens sowie den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses. Diese Merkmale des adaptiven Immunsystems werden generell bei Impfungen nutzbringend angesprochen.

Jede B-Zelle produziert einen Antikörper mit bestimmter Bindungsspezifität. Dieser Antikörper befindet sich als spezifischer Rezeptor auch in der Membran der ihn produzierenden B-Zelle. Die humorale Immunantwort gegen als fremd erkannte Antigene beruht auf der selektiven Aktivierung derjenigen B-Zellen, die solche Antikörper produzieren, die an Epitope des jeweiligen Antigens binden können. Für die Antikörpervielfalt spielen DNA-Rearrangements im Verlauf der B-Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle.

Im menschlichen Serum befinden sich in großer Menge Antikörper verschiedenster Spezifitäten, Isotypen und Subklassen. Die Gesamtkonzentration aller Immunglobuline im Serum beträgt 15 – 20 mg/ml; das heißt, daß ca. 100 g Immunglobuline verschiedenster Spezifitäten dauernd im Blut zirkulieren. Es ist nicht möglich, die genaue Anzahl aller Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität anzugeben. Das theoretisch mögliche Repertoire dürfte bei ca.  $10^{11}$  liegen. Ein

bestimmter Antikörper kann im allgemeinen verschiedene, einander ähnliche Antigene binden, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität und Avidität.

Das Immunsystem muß mit Hilfe endogener Regulationsmechanismen eine Homöostase bezüglich der Verteilung und Gewichtung dieser verschiedenen Spezifitäten aufrecht erhalten. Ein wesentlicher Mechanismus dafür ist das „idiotypische Netzwerk“, das von Niels Jerne vor ca. 25 Jahren postuliert wurde (Jerne, Ann. Immunol. 125C (1974), 373-389): Gegen jeden Idiotyp eines Antikörpers, welcher seine Bindungsspezifität bestimmt, gibt es anti-idiotypische Antikörper, die also an den Idiotyp des ersten Antikörpers im Sinne einer Antigenerkennung binden. Jerne schlug vor, daß die Wechselwirkungen zwischen den Idiotyp-spezifischen Rezeptoren auf Lymphozyten für die Regulation des Immunsystems verantwortlich sein können. Diese Wechselwirkungen finden offensichtlich tatsächlich statt, da gezeigt worden ist, daß im Zuge einer Immunantwort auch anti-idiotypische Antikörper gegen die durch die Immunantwort primär induzierten Antikörper entstehen. Da es gegen jeden Antikörper anti-idiotypische Antikörper gibt, sind Lymphozyten gegenüber Idiotypen von Antikörpern grundsätzlich nicht tolerant.

Einige anti-idiotypische Antikörper können im immunologischen Sinne das „innere Abbild“ eines Antigens darstellen. Solche Antikörper können daher als Surrogat des nominalen Antigens zur Immunisierung verwendet werden, da die durch eine Immunisierung induzierten Antikörper zum Teil an das nominale Antigen binden können. Dieser Ansatz wird seit längerer Zeit insbesondere in der Krebsimmuntherapie verfolgt. Es gibt seit mehr als 10 Jahren eine Reihe von präklinischen und klinischen Projekten, durch Vakzinierung mit monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpern Immunantworten gegen Tumor-assoziierte Antigene hervorzurufen (für eine Zusammenfassung siehe: Bhattacharya-Chatterjee, Foon; Anti-idiotype antibody vaccine therapies of cancer; Cancer Treat. Res. 94 (1998), 51-68). Die meisten dieser monoklonalen anti-idiotypischen Antikörper sind murinen Ursprungs, es gibt aber auch Versuche mit humanen monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpern (z.B. Fagerberg et al., PNAS 92 (1995), 4773-4777).

Einen Spezialfall stellen die Versuche der therapeutischen Immunisierung von Patienten mit B-Zell Lymphomen dar. Bei diesen Erkrankungen entartet ein bestimmter B-Zell Clon, der ein bestimmtes Immunglobulin mit einem dafür

charakteristischen Idiotyp produziert und auch als Rezeptor in der Zellmembran trägt. Dieser Antikörper ist monoklonal und kann als Tumor-spezifisches Antigen für das individuelle B-Zell Lymphom gesehen werden. Es wurde gezeigt, daß solche Patienten-spezifische autologe Antikörper, in Zellkultur hergestellt und in geeignet immunogener Form als Impfstoff verabreicht, eine Immunantwort gegen den Idiotyp dieses Antikörpers hervorrufen können, die eine Wirkung gegen das B-Zell Lymphom aufweisen kann (Reichardt et al., Blood. 93 (1999), 2411-2419).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß

- humane monoklonale anti-idiotypische Antikörper, die ein Tumor-assoziiertes Antigen nachahmen, als Impfstoff in Krebspatienten eine Immunantwort auslösen können, die gegen dieses Tumor- assoziierte Antigen gerichtet sein kann. Solche humane monoklonale Antikörper wurden mittels Hybridomtechnologie oder Immortalisierung humaner B-Zellen aus Patienten gewonnen, die einen (meist murinen) Antitumor-Antikörper zur passiven Immuntherapie erhalten hatten und eine Immunantwort dagegen aufgebaut haben. Mit so hergestellten humanen monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpern wurden dann andere Patienten immunisiert.
- humane Antikörper, die von einem B-Zell Lymphom produziert werden und daher einen definierten Idiotyp haben, Patienten-spezifisch als individuelle Impfung eine Immunantwort auslösen können, die gegen das B-Zell Lymphom gerichtet sein kann. Solche Patienten-spezifische Antikörper müssen mittels Hybridomtechnologie oder Immortalisierung der Zellen des B-Zell Lymphoms individuell gewonnen werden. Ihre Verwendung ist naturgemäß auf die Behandlung von B-Zell Lymphomen beschränkt.

Es ist somit zwar bekannt, daß monoklonale anti-idiotypische Antikörper aus einer bestimmten Spezies zur Immunisierung auch von Individuen der gleichen Spezies, aus der die Antikörper stammen, verwendet werden können. Hierzu müssen aber in jedem Fall Zellen manipuliert und kultiviert werden. Somit ist dieser Ansatz aufwendig und auf monoklonale Antikörper beschränkt.

Es ist somit klar, daß nach wie vor ein Bedarf besteht, Methoden und Mittel zur Verfügung zu stellen, die eine effektive und breit anwendbare und gegebenenfalls

individuelle Behandlung von Tumoren sowie einen Schutz vor Krebserkrankungen ermöglichen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, effiziente und im Rahmen verschiedener Tumorarten individuell einsetzbare Mittel und Verfahren zur Behandlung von Krebs sowie zum Schutz vor Krebserkrankungen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Antikörpern zur Herstellung einer Zusammensetzung, die geeignet ist als Impfstoff zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebs, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper aus Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen werden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assozierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.

Die erfindungsgemäße Verwendung hat gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Methoden den Vorteil, daß zur Herstellung der anti-idiotypischen Antikörper keine Zellkulturen verwendet werden. Dadurch erlaubt das erfindungsgemäße Konzept eine breite und effektive Anwendung und ist nicht auf monoclonale Antikörper beschränkt.

Der Pool von Antikörpern, welche z.B. in insgesamt großer Menge im Blut jedes Menschen vorhanden sind, beinhaltet Antikörper jeder möglichen Bindungsspezifität. Daher beinhaltet dieser Antikörperpool grundsätzlich auch Antikörper (Ab2) gegen den Idiotyp von (bereits bekannten oder aber auch neuen) z.B. murinen monoclonalen Antikörpern (Ab1) gegen beliebige Tumor-assozierte Antigene (TAA). Entsprechend dem immunologischen Netzwerk enthält der gleiche Antikörperpool in jedem Menschen in gewisser Menge auch Antikörper gegen die Idiotypen der autologen Ab2, die sogenannten Ab3-Antikörper. Ab3 können nach der Netzwerktheorie an dem Tumor-assozierten Antigen binden, das durch den externen Ab1 definiert ist. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes Ab2 / Ab3 zugunsten von

Ab3 muß zur Folge haben, daß das Immunsystem Tumorzellen, die dieses Antigen tragen, besser erkennen und angreifen kann.

Basis der vorliegenden Erfindung ist nun, daß eine solche Verschiebung des immunologischen Gleichgewichtes durch Verabreichung einer individuellen autologen Ab2-Fraktion in Form einer immunogenen Vakzine erreicht werden kann. Durch eine solche autologe Impfung können diejenigen B-Zellen selektiv stimuliert werden, die Ab3 produzieren. Für eine solche Impfung sind nur kleine Mengen der Ab2-Fraktion notwendig, die nach an sich bekannten Methoden mit einem geeigneten Vakzinadjuvans immunogen formuliert werden können.

Bei den erfindungsgemäß verwendeten Antikörpern handelt es sich somit um Ab2-Antikörper aus Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeiten, die gegen den zur Immunaffinitätsreinigung eingesetzten anti-TAA-Antikörper gerichtet sind. Körperflüssigkeiten, die Antikörper enthalten, sind beispielsweise Blut, Plasma, Serum, Lymphflüssigkeit, maligne Ergüsse etc. Bevorzugt ist die Körperflüssigkeit Serum. Die Körperflüssigkeit kann dabei aus jedem tierischen Organismus stammen, der Körperflüssigkeiten besitzt, die Antikörper enthalten. Bevorzugt sind dies Vertebraten, besonders bevorzugt Säugetiere und ganz besonders bevorzugt ist die Körperflüssigkeit menschlichen Ursprungs.

Da die durch Vakzinierung mit autologen Antikörpern induzierte Immunantwort durch die Bindungsregion dieser Antikörper, d.h. durch ihren Idiotyp, determiniert wird, können im Prinzip statt intakter Antikörperfraktionen auch Fragmente oder Derivate dieser Antikörper erfolgreich zur Vakzinierung eingesetzt werden, solange diese den Idiotyp der jeweiligen Ausgangs-Antikörper weiterhin beinhalten. Der Begriff "Antikörper" umfaßt daher auch Fragmente oder Derivate solcher Antikörper mit der gleichen Bindungsspezifität. Als Beispiele, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: F(ab)<sub>2</sub>'-Fragmente und F(ab)'-Fragmente, die z.B. nach an sich bekannten biochemischen Methoden (beispielsweise durch enzymatische Spaltung) hergestellt werden können. Der Begriff "Derivat" umfaßt dabei z.B. Antikörperderivate, die nach an sich bekannten chemischen oder biochemischen Methoden hergestellt werden können, wie z.B. mit Fettsäuren an freien Aminofunktionen amidierte Antikörper zwecks Erhöhung der Lipophilie zur Inkorporierung in Liposomen. Insbesondere umfaßt der Begriff auch Produkte, die erzeugt werden können durch chemische Kopplung von Antikörpern oder

Antikörperfragmenten mit Molekülen, die die Immunantwort verstärken können, wie z.B. Tetanus-Toxoid, Pseudomonas Exotoxin, Derivate von Lipid A, GM-CSF, IL-2 oder durch chemische Kopplung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit Polypeptiden, die die Immunantwort verstärken, wie z.B. GM-CSF, IL-2, IL-12, C3d etc. Die Reinigung der Antikörper aus Körperflüssigkeiten, die Antikörper enthalten, z.B. aus menschlichem Serum, mittels Immunaffinitätsreinigung kann dabei nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen (Clin. Chem. 45 (1999), 593; J. Chem. Technol. Biotechnol. 48 (1990), 105). Dabei wird ein TAA-spezifischer Antikörper, bzw. ein Gemisch von Antikörpern, an einer Festphase immobilisiert. Die Festphase kann dabei eine Membrane, ein Gel oder ähnliches Material sein, an das Antikörper ohne wesentlichen Verlust der Bindungseigenschaften gebunden werden können. Die Bindung der Ab2 an die immobilisierten Antikörper kann batchweise oder im Durchfluß-Verfahren erfolgen. Die Immunaffinitätsreinigung kann an einer Chromatographie-Apparatur automatisch oder mittels eines manuellen Verfahrens erfolgen. Es ist aber auch denkbar, daß das Verfahren mittels einer einfachen Vorrichtung, die die immobilisierten Antikörper enthält, manuell, automatisch oder halbautomatisch durchgeführt wird. Bei einer Immunaffinitätschromatographie, in Beispiel 1 beschrieben, erhält man in der Regel zwischen 3 – 10 µg Immunglobulin pro ml eingesetzten Serums. Im allgemeinen besteht die so erhaltene Antikörperfraktion sowohl aus IgM als auch aus IgG. Es ist also möglich, aus einer für eine Blutabnahme akzeptablen Menge von z.B. 50 ml, die zu ca. 25 ml Serum führt, ca. 0,08 – 0,25 mg Ab2 zu gewinnen. Diese Menge reicht an sich bereits zur Vakzinierung. Falls es gewünscht ist, größere Mengen von Ab2 zu gewinnen, können auch an sich bekannte Techniken der Plasmapherese, kombiniert mit Immunaffinitätsreinigung, eingesetzt werden. Wenn mehrere Antikörper verschiedener Spezifität verwendet werden, können diese immobilisierten Antikörper simultan verwendet werden oder einzelne Immunaffinitätsreinigungen parallel oder seriell erfolgen.

Unter dem Begriff "Tumor-assoziiertes Antigen" wird im Rahmen der vorliegenden Anmeldung eine Struktur verstanden, die bevorzugt von Tumorzellen präsentiert wird und dadurch eine Unterscheidung zu nicht-malignem Gewebe ermöglicht. Vorzugsweise ist ein solches Tumor-assoziiertes Antigen auf bzw. in der Zellmembran einer Tumorzelle lokalisiert. Dabei ist aber nicht ausgeschlossen, daß

derartige Antigene auch auf nicht-entarteten Zellen vorkommen. Bei Tumor-assoziierten Antigenen kann es sich beispielsweise um Polypeptide, insbesondere glykosylierte Proteine, oder Glykosylierungsmuster von Polypeptiden handeln. Andere Strukturen, die ein Tumor-assoziiertes Antigen darstellen können, sind z.B. Glykolipide. Hierzu gehören beispielsweise Ganglioside, wie z.B. GM2. Ferner können Tumor-assoziierte Antigene dargestellt werden durch Veränderungen der Zusammensetzung von Lipiden der Zellmembran, die für Krebszellen charakteristisch sein können.

Verschiedenste Antikörper gegen verschiedene Tumor-assoziierte Antigene sind seit langem bekannt oder können mit an sich bekannten Methoden (z.B. Hybridomtechnologie, Phagendisplay-Technik) hergestellt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die durch Immunaffinitätsreinigung erhaltenen Antikörper im Sinne eines autologen, individuellen Impfstoffes jeweils demjenigen Individuum verabreicht, aus deren Körperflüssigkeit sie gewonnen worden sind.

Ein weiterer integraler Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist somit, daß die Gewinnung einer Ab2-Fraktion aus der Körperflüssigkeit, z.B. Blut, eines Individuums durch Immunaffinitätsreinigung dieser in der Körperflüssigkeit befindlichen Antikörper erfolgen kann. Als Ligand wird ein – oder werden mehrere –Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene verwendet.

Ein Individuum kann in diesem Zusammenhang jeder beliebige tierische Organismus sein, vorzugsweise ein Vertebrat, besonders bevorzugt ein Säuger und ganz besonders bevorzugt ein Mensch.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden für die Immunaffinitätsreinigung gleichzeitig mehrere Antikörper gegen verschiedene Tumor-assoziierte Antigene und/oder gegen verschiedene Epitope eines oder mehrerer Tumor-assozierter Antigene verwendet.

Werden für die Immunaffinitätsreinigung der in Körperflüssigkeiten befindlichen Ab2 mehrere, insbesondere monoklonale, Antikörper gegen verschiedene Tumor-assoziierte Antigene oder gegen verschiedene Epitope gleichzeitig verwendet, so erhält man eine Fraktion unterschiedlicher Ab2, die auf dem gewählten Set von

Tumor-assoziierten Antigenen beruht und deren gleichzeitige Verwendung als Impfstoff eine Immunantwort gegen alle diese Tumor-assoziierten Antigene oder Epitope hervorruft. Damit wird also das immunologische Gleichgewicht in einem Schritt in Richtung der Erkennung eines Sets von (oft co-exprimierten) Tumor-assoziierten Antigenen oder Epitopen verschoben. Eine solche Vorgangsweise erhöht naturgemäß die Wirksamkeit der induzierten Immunantwort und verringert essentiell die Ausbildung von Antigen-negativen Varianten des Tumors („tumor escape“), da es extrem unwahrscheinlich ist, daß eine Tumorzelle die Expression mehrerer Antigene gleichzeitig abschalten kann.

Grundsätzlich kann die oben beschriebene Methode auf allen bekannten oder neu entdeckten Tumor-assoziierten Antigenen beruhen. Voraussetzung ist nur, daß ein oder mehrere Antikörper, vorzugsweise monoklonale Antikörper, gegen ein solches Antigen verfügbar sind, die als Ligand für eine Immunaffinitätsreinigung verwendet werden können. Es eignen sich grundsätzlich alle denkbaren Arten von Antikörpern, insbesondere polyclonale oder monoklonale, wobei monoklonale Antikörper bevorzugt sind. Es könne auch Mischungen von polyclonalen und monoclonalen Antikörpern eingesetzt werden. Auch können sowohl z.B. murine monoklonale Antikörper als auch Antikörper aus anderen Spezies (z.B. Ratte) verwendet werden. Weiter sind auch Maus-Human chimärische, humanisierte oder humane monoklonale Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene einsetzbar. Die Eigenschaft der für die Immunaffinitätsreinigung eingesetzten Antikörper ist durch ihre Bindungsregion, das heißt ihrem Idiotyp, determiniert. Daher können im Prinzip statt intakter Antikörper auch Fragmente dieser Antikörper erfolgreich zur Immunaffinitätsreinigung eingesetzt werden, solange diese Fragmente den Idiotyp der jeweiligen Ausgangs-Antikörper weiterhin beinhalten. Als Beispiele, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt:  $F(ab)'$ -Fragmente,  $F(ab)''$ -Fragmente und Fv-Fragmente, die nach an sich bekannten biochemischen Methoden (enzymatische Spaltung) oder nach an sich bekannten molekularbiologischen Methoden hergestellt werden können. Es können selbstverständlich Mischungen der jeweiligen Arten von Antikörpern oder Fragmente eingesetzt werden.

Die Auswahl der Tumor-assoziierten Antigene und damit der für die Immunaffinitätsreinigung eingesetzten Antikörper gegen diese Antigene hängt mit der Antigencharakteristik der Tumorindikation zusammen, gegen die geimpft werden soll.

Folgende bereits bekannte Tumor-assoziierte Antigene, die auf verschiedenen, insbesondere epithelialen Tumoren häufig exprimiert sind, sind beispielhaft angeführt, aber die Anwendung der hier beschriebenen Methode der autologen Vakzinierung ist in keiner Weise auf diese Antigene beschränkt:

Epitheliales Zell Adhäsions Molekül (Ep-CAM)

Carcino Embryonales Antigen (CEA)

Lewis Y Kohlenhydrat

Sialyl Tn Kohlenhydrat

Globo H Kohlenhydrat

Ganglioside wie GD2 / GD3 / GM2

Prostate Specific Antigen (PSA)

CA 125

CA 19-9

CA 15-3

TAG-72

EGF-Rezeptor

Neuronales Zell Adhäsions Molekül (N-CAM)

Her2/Neu Rezeptor

D 97

CD 20

CD 21

Gegen alle genannten Antigene sind (meistens mehrere), insbesondere monoklonale, Antikörper beschrieben worden, die sich im Prinzip alle als Liganden für die oben beschriebene Immunaffinitätsreinigung zur Gewinnung von Ab2 eignen.

Weitere Tumor-assoziierte Antigene werden z.B. beschrieben in DeVita et al. (Eds., "Biological Therapy of Cancer", 2. Auflage, Kapitel 3: Biology of Tumor Antigens, Lippincott Company, ISBN 0-397-5144116-6 (1995)).

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Tumor-assoziierte Antigen ein membranständiges Molekül, das auf Krebszellen epithelialen Ursprungs, auf

Krebszellen neuro-endokrinen Ursprungs oder auf Krebszellen des blutbildenden Systems häufig exprimiert oder co-exprimiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäß hergestellte Zusammensetzung geeignet für eine mehrfache Verabreichung der darin enthaltenen Antikörper.

Die hier beschriebene Methode zur Gewinnung eines autologen Impfstoffes aus Körperflüssigkeiten eines Individuums ist naturgemäß nicht auf nur eine Anwendung beschränkt.

Die durch eine erste Impfung hervorgerufene Verschiebung des immunologischen Repertoires in Richtung Antitumor-Wirksamkeit kann durch Wiederholungen dieses Vorganges weiter verstärkt werden, z.B. kann einige Wochen nach Gewinnung der ersten autologen Vakzine durch Immunaffinitätsreinigung erneut Körperflüssigkeit, z.B. Blut, abgenommen und erneut eine autologe Vakzine präpariert und verabreicht werden. Dadurch wird auch gewährleistet, daß der jeweilige Status des immunologischen Gleichgewichtes in der individuellen Vakzine immer berücksichtigt ist. Dieser Vorgang kann in geeigneten Abständen immer wieder durchgeführt werden (beispielhaft zunächst alle 4 – 8 Wochen, in weiterer Folge alle 6 Monate).

Die hier beschriebene neue Zusammensetzung und Methode zur Impfung mit autologen Antikörpern eignet sich grundsätzlich sowohl für therapeutische als auch prophylaktische Zwecke. Eine wiederholte therapeutische Vakzinierung von Krebspatienten kann die Ausbildung neuer Metastasen unterdrücken und die Disseminierung der Erkrankung zumindestens verlangsamen. Therapeutische autologe Impfungen können insbesondere in folgenden Stadien der Erkrankung nutzbringend sein:

In frühen Krankheitsstadien, zum Beispiel nach erfolgreicher Operation eines Primärtumors (adjuvantes Stadium), werden durch die hier beschriebenen autologen Impfungen restliche, disseminierte Tumorzellen zerstört und daran gehindert, sich als neue Metastasen zu etablieren. Dadurch kann die rückfallsfreie Lebensspanne und damit auch die Gesamtüberlebenszeit solcher Patienten verlängert werden. Durch solche autologe Impfungen und in geeigneten Abständen durchgeführte

Auffrischungsimpfungen kann gegebenenfalls ein lebenslanger Schutz vor der Ausbildung von Metastasen erreicht werden.

Wenn bereits Metastasen aufgetreten sind, kann durch die hier beschriebenen Zusammensetzung bzw. autologen Impfungen die Ausbreitung und Ausbildung weiterer Metastasen eingedämmt werden. Dadurch wird das Krankheitsgeschehen stabilisiert, wobei bei Erhalt der Lebensqualität eine Verlängerung der Lebenszeit erreicht werden kann.

Die hier beschriebene Strategie autologer Impfungen kann auch in Patienten angewendet werden, die zuvor aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen bereits einen monoklonalen Antikörper gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen verabreicht bekommen haben und dagegen eine Immunantwort aufgebaut haben. Das führt nämlich dazu, daß bei der Immunaffinitätsreinigung mit diesem Antikörper als Liganden Antikörper dagegen (Ab2) in größerer Menge als bei nicht behandelten Individuen erhalten werden. Die Impfung mit diesen Ab2 verstärkt dann die Ausbildung eventuell bereits intrinsisch entstandener Ab3. Die intrinsische Induktion von Ab3 mit potentiellen Antitumoreigenschaften via Induktion von Ab2 durch passive Immuntherapie mit murinen Antikörpern gegen Tumor-assoziierte Antigene (Ab1), die i.v. an Krebspatienten gegeben werden, wird seit vielen Jahren postuliert und untersucht (z.B. Koprowski et al., PNAS 81 (1984), 216-19).

Die hier beschriebenen Zusammensetzung und autologen Impfungen können prinzipiell auch dafür verwendet werden, prophylaktisch einen erhöhten Schutz gegen die Ausbildung von Krebserkrankungen in gesunden Individuen aufzubauen. Eine solche Maßnahme kann sich insbesondere in Risikogruppen als sinnvoll erweisen (hierzu gehören z.B. Individuen mit einer genetischen Disposition, bestimmte Krebserkrankungen zu entwickeln, was in steigendem Ausmaß durch entsprechende Tests erhoben werden kann).

Ein genereller Vorzug der hier beschriebenen Strategie der individuellen autologen Impfung liegt in der Tatsache, daß der immunologische Status des jeweiligen Individuums bezüglich des idiotypischen Netzwerkes berücksichtigt wird, da der entsprechende Impfstoff vorzugsweise jeweils aus der individuellen Körperflüssigkeit, z.B. Serum, hergestellt wird.

Desweiteren kommt das immunisierte Individuum dabei mit keinen Fremdantigenen in Berührung, sondern wird in geeigneter Form nur mit körpereigenen Bestandteilen behandelt, die eine Modulation des immunologischen Gleichgewichtes bewirken.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird erfindungsgemäß der durch Immunaffinitätsreinigung erhaltene Antikörper mit einem geeigneten Vakzineadjuvans formuliert.

Wie bei Impfstoffen üblich, können die autologen Antikörperfraktionen oder deren Fragmente und Derivate mit Vakzine-Adjuvantien gemeinsam formuliert werden. Durch solche Adjuvantien wird die Immunantwort verstärkt. Als Beispiele für Adjuvantien, jedoch nicht auf diese eingeschränkt, seien erwähnt: Aluminium-haltige Adjuvantien, insbesondere Aluminium-hydroxid (z.B. Alu-Gel), Derivate von Lipopolysaccharid, Bacillus Calmette Guerin (BCG), QS-21, Liposomenbereitungen, Formulierungen mit zusätzlichen Antigenen, gegen die das Immunsystem bereits eine starke Immunantwort gemacht hat, wie z.B. Tetanus Toxoid oder Bestandteile von Influenza Viren, gegebenenfalls in einer Liposomenbereitung.

Die Impfstoffbereitung kann zur Verstärkung der Immunantwort auch mit entsprechenden, vorzugsweise humanen, Zytokinen, die den Aufbau einer Immunantwort unterstützen, verabreicht werden. Hier ist insbesondere, wenn auch nicht ausschließlich, Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF) zu erwähnen. Dieses Zytokin stimuliert durch Aktivierung von Antigen-prozessierenden Zellen (z.B. dendritische Zellen) eine effiziente Immunantwort.

Gegebenenfalls können die autologen Antikörperfraktionen auch nach an sich bekannten und publizierten Methoden mit autologen, ex-vivo kultivierten dendritischen Zellen inkubiert werden. Die so gepulsten dendritischen Zellen werden anschließend dem jeweiligen Individuum wieder verabreicht. Auf diese Weise kann eine besonders effiziente Immunantwort erreicht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden die in der Zusammensetzung enthaltenen Antikörper mit einem Adjuvans gemischt und anschließend einer Hitzebehandlung vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 70 und 121°C unterzogen. Das verwendete Adjuvans ist vorzugsweise ein aluminiumhaltiges Adjuvans. Es ist möglich, daß eine derartige Hitzebehandlung das

Protein-Antigen zwar denaturiert, die immunogenen Teile des Proteins aber durch die Bindung an das Adjuvans dem Immunsystem in der richtigen Form präsentiert werden können. Es ist aber nicht unbedingt notwendig, die Proteine zu denaturieren um die Vorteile einer Hitzebehandlung zu erhalten. Es ist bekannt, daß die thermische Denaturierung von Proteinen nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Zeit, der das Protein dieser Temperatur ausgesetzt ist, abhängt. Darüberhinaus sind noch weitere physikalisch chemische Parameter, wie z.B. Ionenstärke, Ionenzusammensetzung, pH-Wert, Art und Menge der aktiven Oberfläche im Gemisch für die Denaturierung eines Proteins verantwortlich. Es sind Bedingungen vorstellbar, bei denen die Antikörper nicht oder nicht vollständig denaturiert werden und/oder andere Effekte, wie zum Beispiel schwächere Desorption von der Oberfläche des Adjuvans, genutzt werden können.

Ein weiterer Vorteil einer derartigen Herstellungsweise einer Impfstoffformulierung mit einem Adjuvans und der darauffolgenden Hitzebehandlung ist, daß in der gesamten Formulierung infektiöse Erreger abgeschwächt, bzw. inaktiviert werden könnten. Dieser Vorteil kann sowohl in der Herstellung als auch bei der Lagerung und Distribution der Impfstoffformulierung eine Rolle spielen. Es ist damit eine größere Sicherheit in Bezug auf bekannte und unbekannte Erreger von übertragbaren Krankheiten gegeben. Darüberhinaus ist, bei entsprechender Verpackung eine Abfüllung ohne Konservierungsstoffe möglich, da die mikrobielle Konservierung des Impfstoffes durch Hitze erfolgt ist.

Ein weiterer Vorteil einer derartigen Formulierung ist die mögliche erhöhte Immunogenität der Antikörper, da die Erhitzung eine zumindest teilweise Denaturierung der Antikörper bewirken kann. Diese erhöhte Antigenität kann im Besonderen bei Proteinen, die vom Immunsystem als eigene Proteine erkannt werden würden, die Immunogenität erhöhen.

Ein weiterer Vorteil ist eine mögliche zusätzliche Stabilisierung des Antikörper-Adjuvans Komplexes durch die Hitzeinaktivierung, d.h. die Desorption des Protein-Antigens erfolgt nicht mehr so schnell wie in Antigen-Adjuvans Formulierungen, die nicht hitzebehandelt worden sind. Dieser Vorteil erlaubt unter Umständen auch einen größeren zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Immunisierungen.

Die erfindungsgemäß hergestellte Zusammensetzung kann nach gängigen Methoden verabreicht werden, z.B. als Impfstoff durch subkutane oder intramuskuläre Injektion.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend Antikörper, die aus Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor- assoziierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.

Derartige Zusammensetzungen eignen sich wie oben beschrieben als Impfstoffe zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebserkrankungen.

Für die bevorzugten Ausführungsformen der Herstellung, der Bestandteile, der Formulierung, der Verabreichungsarten etc. der pharmazeutischen Zusammensetzung gilt das, was oben bereits im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung ausgeführt wurde.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend isolierte, ex-vivo kultivierte dendritische Zellen eines Individuums, wobei die dendritischen Zellen zuvor mit Antikörpern in-vitro inkubiert wurden, welche wie oben beschrieben aus einer Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeit desselben Individuums durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden.

Des Weiteren betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebs, wobei einem Individuum Antikörper verabreicht werden, die aus Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeiten, vorzugsweise aus Körperflüssigkeiten desselben Individuums, durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor- assoziierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.

Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebs, wobei einem Individuum autologe ex-vivo kultivierte, isolierte dendritische Zellen verabreicht werden, die zuvor in-vitro mit Antikörpern inkubiert wurden, welche aus Antikörper enthaltenden

Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.

Für die bevorzugten Ausführungsformen gilt das bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung Gesagte.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer Antikörperpräparation dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeit durch Immunaffinitätsreinigung Antikörper gewonnen werden,, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene erkennen, oder deren Fragment mit gleichem Idiotyp.

Für die Körperflüssigkeiten, die als Liganden verwendeten Antikörper sowie für die Tumor-assoziierten Antigene gilt dasselbe, was bereits oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung gesagt wurde.

Die Immunaffinitätsreinigung kann nach dem Fachmann bekannten Methoden durchgeführt werden. Auch hier gilt das bereits im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung gesagte.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden für die Affinitätsreinigung gleichzeitig mehrere Antikörper gegen verschiedene Tumor-assoziierte Antigene und/oder Epitope solcher Antigene verwendet. Hierbei können bei dem Ansatz, bei dem mehrere Antikörper für die Affinitätsreinigung verwendet werden, diese entweder simultan eingesetzt werden oder einzelne Immunaffinitätsreinigungen parallel oder seriell erfolgen. D.h. es können verschiedene Epitop- und/oder Antigen-Spezifitäten den Anforderungen entsprechend kombiniert werden. Diese Anforderungen ergeben sich aus der Expression verschiedener Tumorantigene auf verschiedenen individuellen Tumoren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden als Liganden in der Affinitätsreinigung monoklonale Antikörper verwendet und bei einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird als Körperflüssigkeit Serum verwendet.

Bei einem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich vorzugsweise um ein Verfahren zur Herstellung einer Antikörperpräparation, die verwendet wird für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet als Impfstoff zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebs.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei ein oben beschriebenes erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung einer Antikörperpräparation durchgeführt wird und die so erhaltene Antikörperpräparation anschließend mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einem geeigneten Vakzineadjuvans formuliert wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Antikörperpräparation mit einem Adjuvans, vorzugsweise einem aluminiumhaltigen Adjuvans, gemischt und anschließend einer Hitzebehandlung, vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 70 und 121°C, unterworfen.

Für bevorzugte Ausführungsformen einer solchen pharmazeutischen oder Impfstoffformulierung gilt das oben im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verwendung Gesagte.

Der Offenbarungsgehalt aller in der vorliegenden Anmeldung zitierten Patente, Publikationen oder Datenbankeinträge ist hiermit unter Bezugnahme in seiner Gesamtheit in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung eingeschlossen.

**Figur 1** zeigt ein Chromatogramm einer Immunaffinitätsreinigung (mittels immobilisiertem Antikörper 17-1A) der Antikörperfraktion aus Serum eines Rhesusaffen.

**Figur 2** zeigt ein Chromatogramm (Größentrennungschromatographie) einer Immunaffinitätsgereinigten Antikörperfraktion.

**Figur 3** zeigt die Bindung von Serum-Antikörpern, die durch Affinitätsreinigung an Antikörper 17-1A gewonnen wurden: 17-1A ELISA.

**Figur 4** zeigt das Ergebnis einer autologen Impfung eines Rhesusaffen: Bindung von Serum-Ig an KatoIII Tumorzellen (Zell-ELISA).

**Figur 5** zeigt ein Chromatogramm (Größentrennungschromatographie) einer immunaffinitätsgereinigten Antikörperfraktion (Mischbett anti-EpCAM/anti-LewisY).

**Figur 6** zeigt ein Chromatogramm eines Größenstandards (aufgetrennt durch Größentrennungschromatographie).

In den nun folgenden Beispielen, die die vorliegende Erfindung weiter erläutern, aber nicht einschränken sollen, wurden folgende Materialien verwendet:

Mikrotiterplatten: Immuno Plate F96 MaxiSorp (Nunc) für ELISA  
Cell Culture Cluster (Costar; Cat.Nr. 3598)  
für Zell-ELISA

Zelllinie: KATO III: menschliche Magenkrebszelllinie  
(ATCC HTB 103)

Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>  
0,5 M NaCl  
pH-Wert 8,0

Reinigungspuffer A: PBS def  
0,2 M NaCl

Reinigungspuffer B: 0,1 M Glycin / HCl  
0,2 M NaCl

	pH-Wert 2,9
Medium A:	RPMI 1640 + 2 g/l NaHCO <sub>3</sub> 100 U/ml Penicillin G 100 µg/ml Streptomycinsulfat 4 mM Glutamin 10 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
Bindungspuffer:	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 35 mM NaHCO <sub>3</sub> 3 mM NaN <sub>3</sub> pH-Wert: 9,6
PBS deficient (def):	138 mM NaCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH-Wert: 7,2
Fixierlösung:	0,1 % Glutardialdehyd in physiologischer NaCl-Lösung
Waschpuffer A:	2% NaCl 0,2% Triton X-100 in PBS deficient
Waschpuffer B:	0,05 % Tween 20 in PBS deficient
Blockierungspuffer A:	5 % foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert) in PBS deficient
Blockierungspuffer B:	1 % Rinderserumalbumin 0,1 % NaN <sub>3</sub> in PBS deficient

Verdünnungspuffer A: 2% foetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)  
in PBS deficient

Verdünnungspuffer B: PBS deficient

Färbepuffer: 24,3 mM Zitronensäure  
51,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH-Wert: 5,0

Substrat: 40 mg o-Phenyldiamin Dihydrochlorid  
100 ml Färbepuffer  
20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

Stopplösung: 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Formulierungspuffer: 10 % PBS def, pH = 6,0  
90 % physiologische NaCl-Lösung

### Beispiel 1

#### Herstellung einer Immuno-Affinitäts-Säule mit einem TAA-spezifischen Antikörper

7,5 g CH-Sepharose 4B (Pharmacia) wurden für 15 Minuten in 20 ml 1 mM HCl suspendiert. Das Gel wurde dann mit 1 Liter 1 mM HCl und anschließend mit 200 ml Kopplungspuffer auf einem Sinterglasfilter AG3 gewaschen. 100 mg muriner Antikörper 17-1A (Panorex, Stammlösung 10 mg/ml; gerichtet gegen das Tumor-assoziierte Antigen Ep-CAM) wurden gegen 5 Liter Kopplungspuffer dialysiert und mit Kopplungspuffer auf 5 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde mit der Gelsuspension in einem verschlossenen Gefäß vermischt. Ein Verhältnis von Gel : Puffer von 1 : 2 ergibt eine für die Kopplung geeignete Suspension. Diese Suspension wurde 24 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurde der Überschuß des Liganden mit 3 x 30

ml Kopplungspuffer weggewaschen. Überbleibende reaktive Gruppen wurden durch einstündige Inkubation bei 4°C mit 1 M Äthanolamin geblockt. Dann wurde das Gel für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem 0,1 M Tris-HCl Puffer rotiert. Letztlich wurde das Gel mit 3 Zyklen von Puffern mit alternierendem pH gewaschen. Jeder Zyklus besteht aus 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4 mit 0,5 M NaCl, und anschließend 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8 mit 0,5 M NaCl. Das Gel wurde bei 4°C aufbewahrt.

### Beispiel 2

#### Immunaffinitätsreinigung einer Antikörperfraktion aus Serum mittels Immun-Affinitätschromatographie

Rhesusaffen wurde 10 ml peripheres Blut abgenommen und daraus Serum gewonnen. Die ganze Prozedur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt:

Die Immunaffinitätsreinigung wurde auf einem FPLC-System (Pharmacia) durchgeführt. 1 ml des nach Beispiel 1 erhaltenen Gels wurde in eine Pharmacia HR5/5 Säule gefüllt. 5 ml Serum wurden 1:10 mit dem Reinigungspuffer A verdünnt. Diese Lösung wurde mit 1 ml / Minute über die Säule gepumpt und mit Reinigungspuffer A nachgewaschen, bis die UV-Basislinie des Detektors wieder erreicht ist (280 nm). Gebundene Immunglobuline wurden dann mit Reinigungspuffer B eluiert und die Fraktion mit 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> unmittelbar nach Desorption neutralisiert. Ein Chromatogramm dieser Reinigung (UV 280 nm) findet sich in Figur 1.

50µl der so gereinigten Antikörperfraktion wurden auf einer Größentrennungssäule (SEC, Zorbax 250 GF) analysiert. Als Laufmittel wurde 220 mM Phosphatpuffer pH 7 + 10% Acetonitril verwendet. Wie aus dem Chromatogramm dieser Analyse ersichtlich ist (Figur 2), beinhaltet die Antikörperfraktion IgM und IgG im Verhältnis von ca. 3:2. Die Gesamtmenge der Antikörperfraktion betrug ca 40 µg (bestimmt mittels SEC im Vergleich zu einem Standard).

Die so gewonnene Antikörperfraktion wurde in einem ELISA bezüglich der Bindung an Antikörper 17-1A (der zur Affinitätsreinigung als Ligand verwendet wurde) getestet:

100 µl Aliquots des für die Affinitätsreinigung eingesetzten Antikörpers gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen (Antikörper 17-1A; Lösung mit 10µg/ml in Bindungspuffer) wurden in den Näpfchen einer Mikrotiterplatte 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer A wurden je 200µl des Blockierungspuffers A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben wurden je 100µl Aliquots der zu testenden affinitätsgereinigten Antikörperfraktion sowie normales Humanimmunglobulin in gleicher Konzentration als Negativkontrolle in Verdünnungen von 1:4 bis 1:65 000 in Verdünnungspuffer A 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Platte wie oben beschrieben wurden je 100µl des Peroxidase-konjugierten Ziegen-anti-Human-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde viermal mit Waschpuffer A und zweimal mit Färbepuffer gewaschen. Die Antikörperbindung wurde durch Zusatz von je 100µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Stopplösung nach ca. 3 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgte durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Wie in Figur 3 ersichtlich ist, zeigt die affinitätsgereinigte Antikörperfraktion eine deutliche Bindung an den Antikörper 17-1A, während normales Human-Immunglobulin praktisch nicht bindet.

### **Beispiel 3**

#### **Formulierung eines Impfstoffes aus gereinigten Antikörpern**

Die durch Affinitätsreinigung erhaltene Antikörperfraktion wurde mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans nach folgender Vorschrift formuliert:

3 ml der nach Affinitätschromatographie erhaltenen Antikörperlösung (enthält ca 40 µg Antikörper) wurden mit 1 mg Aluminiumhydroxid (wässrige Suspension;

Alhydrogel, Superfos) versetzt und die Suspension in einem „FILTRON“ Zentrifugenrörchen (Microsep <sup>TM</sup>, cut-off 10KD) bei 4000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde 2 x mit je 1ml des Formulierungspuffers aufgeschlämmt und bei 4000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert. Die Suspension wurde mit Formulierungspuffer auf 0,5 ml aufgefüllt und die so erhaltene Suspension steril abgefüllt.

#### **Beispiel 4**

#### **Immunisierung von Rhesusaffen mit autologen, immun-affinitätsgereinigten Antikörpern**

Der jeweilige Rhesusaffe, aus dessen Serum der Impfstoff wie in Beispiel 2 und 3 gewonnen und hergestellt wurde, wurde mit diesem Impfstoff subkutan in den Rücken geimpft. Vor dieser ersten Impfung wurden 5 ml Blut zur Serumgewinnung (zur Bestimmung des Ausgangswertes für die Charakterisierung der Immunantwort) abgenommen. Zwei Wochen danach wurden erneut 10 ml Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Mit 4 ml dieses Serums wurde die Gewinnung eines autologen Impfstoffes wiederholt, wie oben beschrieben. Der so erneut gewonnene Impfstoff wurde dem Rhesusaffen wieder subkutan in den Rücken injiziert. 4 Wochen nach dieser Impfung wurden wieder 5 ml Blut zur Serumgewinnung abgenommen (zur Bestimmung des Effektes der beiden Impfungen).

Das Prä-Serum dieses Rhesusaffen und das Immunserum 4 Wochen nach der 2. Impfung wurde in einem Zell-ELISA auf Bindung von Antikörpern auf die Kato III Zelllinie untersucht. Zu diesem Zweck wurde wie folgt vorgegangen:

Die Näpfchen einer Mikrotiterplatte wurden mit je 100 µl einer Zellsuspension der Kato III Zelllinie in der Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Medium A über Nacht bei +37°C inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Platte mit je 50µl Fixierlösung pro Loch 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden je 200µl Blockierungspuffer B zupipettiert und die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200µl Waschpuffer B wurden je 100µl Aliquots der zu testenden Affenserien in Verdünnungen von 1:4 bis 1:56 000 in Verdünnungspuffer B 1 Stunde bei 37°C

inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B wurden je 100µl eines Peroxidase konjugierten Ziegen-anti-Human-Ig Antikörpers (Zymed) in einer Verdünnung von 1:1000 in Verdünnungspuffer A zugesetzt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit je 100 µl eiskaltem Waschpuffer B gewaschen. Die Antikörperbindung wurde durch Zusatz von je 100µl des spezifischen Substrats nachgewiesen und die Farbreaktion durch Zugabe von je 50µl Stopplösung nach ca. 5 Minuten abgebrochen. Die Auswertung erfolgte durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 490nm (Wellenlänge der Referenzmessung ist 620nm).

Wie aus Figur 4 ersichtlich ist, befinden sich im Immunserum des autolog geimpften Rhesuaffen Immunglobuline, die auf Kato III Tumorzellen binden können, während im Prä-Serum desselben Tieres solche Antikörper kaum nachweisbar sind.

Auf Grund der Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente ist beispielhaft gezeigt, daß die Vakzinierung mit individuellen autologen Antikörperfraktionen, die durch Immunaffinitätsreinigung an einem monoklonalen Antikörper gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen erhalten wurden, eine humorale Immunantwort ausgelöst wurde, die auf menschlichen Tumorzellen, die dieses Tumor-assoziierte Antigen exprimieren, bindet.

#### **Beispiel 5:**

#### **Herstellung einer Immun-Affinitäts-Säule mit zwei verschiedenen TAA-spezifischen Antikörpern**

Ein monoklonaler Maus-Antikörper, der mit EpCAM reagiert und ein monoklonaler Maus-Antikörper, der mit Lewis Y reagiert, wurden jeweils an aktivierte CH Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Schweden) nach Standardprozeduren gekoppelt: 7,5 g CH Sepharose 4B wurden 15 Minuten in 20 ml 1 mM HCl suspendiert und gequollen. Das Gel wurde dann mit 1 Liter 1mM HCl und anschließend mit 200 ml Kopplungspuffer auf einem Sinterglasfilter AG3 gewaschen. 100 mg muriner Antikörper (Stammlösung 10 mg/ml) wurden gegen 5 Liter Kopplungspuffer dialysiert und mit Kopplungspuffer auf 5 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde mit der Gelsuspension in einem verschlossenen Gefäß vermischt. Ein Verhältnis von Gel :

Puffer von 1 : 2 ergibt eine für die Kopplung geeignete Suspension. Diese Suspension wurde 24 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend wurde der Überschuß des Liganden mit 3 x 30 ml Kopplungspuffer weggeschüttet. Überbleibende reaktive Gruppen wurden durch einstündige Inkubation bei 4°C mit 1 M Äthanolamin geblockt. Dann wurde das Gel für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem 0,1 M Tris-HCl Puffer rotiert. Letztlich wurde das Gel mit 3 Zyklen von Puffern mit alternierendem pH gewaschen. Jeder Zyklus besteht aus 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4 mit 0,5 M NaCl, und anschließend 0,1 M Tris-HCl Puffer pH 8 mit 0,5 M NaCl. Das Gel wurde bei 4°C aufbewahrt.

Gleiche Volumina der beiden Affinitätsmatrices wurden gemischt und als Immunaffinitäts-Chromatographiesäule gepackt (System Äkta, Pharmacia, Schweden)

#### **Beispiel 6:**

#### **Reinigung von Antikörpern aus Affenserum durch simultane Immunaffinitätsreinigung mit zwei verschiedenen TAA spezifischen Antikörpern**

Immunologisch naiven Rhesusaffen wurde jeweils ungefähr 20 ml Blut abgenommen, jeweils 9 ml Serum wurden mittels der in Beispiel 5 beschriebenen Immunaffinitätschromatographie-Säule gereinigt (System Äkta, Pharmacia, Schweden).

Auftragepuffer: Reinigungspuffer A

Elutionspuffer: Reinigungspuffer B

Das Eluat wurde mit 0,5 M Natriumhydrogenphosphat-Lösung neutralisiert.

Die Eluate wurden derart fraktioniert, daß die gereinigten Proteine in hoher Konzentration vorliegen.

50µl der gereinigten Antikörperfraktion wurden auf einer Größentrennungssäule (SEC, Zorbax 250 GF) analysiert. Als Laufmittel wurde 220 mM Phosphatpuffer pH 7 + 10% Acetonitril verwendet (Flow: 1,000 ml/min; Wavelength 214 nm). Wie aus dem Chromatogramm dieser Analyse ersichtlich ist (Figur 5), beinhaltet die

Antikörperfraktion IgM (Retentionszeit 6,963 min.) und IgG (Retentionszeit 8,745 min.) im Verhältnis von ca. 3:2. Die Gesamtmenge der Antikörperfraktion betrug ca. 50 µg (bestimmt mittels SEC im Vergleich zu einem Standard, Figur 6).

**Beispiel 7:**

**Verschiedene Formulierungen eines Impfstoffes aus gereinigten Antikörpern**

Der Impfstoff wurde in Ultrafiltrationseinheiten zum Zentrifugieren (Centricon 10; Amicon, USA) formuliert. Dazu wurden die Ultrafiltrationseinheiten mittels 1mM Na-Phosphatpuffer, 0,86% NaCl pH 6,0 (NBK) durch zentrifugieren gewaschen.

Danach wurde 1 ml Puffer (NBK) vorgelegt und 37µl Alhydrogel 2% (Superfos Biosector, Dänemark) zugegeben.

Nach Zugabe des neutralisierten Eluates aus Beispiel 6 wurde entsprechend der Centricon-Vorschrift zentrifugiert und gewaschen (mit 5ml Puffer).

Anschließend wurde die Vakzine resuspendiert, aufgefüllt auf 550µl mit Puffer und steril abgefüllt.

Alternativ wurde die Vakzine nach dem Resuspendieren mit Puffer auf 545µl aufgefüllt und mit 5,5µl Thimerosalstammlösung (10mg/ml, Sigma, USA) versetzt.

Eine dritte Variante der Impfstoff-Formulierung wurde nach dem sterilen Abfüllen in Glasfläschchen in einem Autoklaven hitzedenaturiert (121°C; 20 min.).

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung von Antikörpern zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet als Impfstoff zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung gegen Krebs, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper aus Antikörpern enthaltend Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen werden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assoziierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung bestimmt ist zur Verabreichung an das Individuum, aus dessen Körperflüssigkeit die Antikörper gewonnen wurden im Sinne eines autologen, individuellen Impfstoffes.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Körperflüssigkeit Serum ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Individuum ein Mensch ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei für die Immunaffinitätsreinigung gleichzeitig mehrere Antikörper gegen verschiedene Tumor-assoziierte Antigene und/oder verschiedene Epitope solcher Antigene verwendet werden.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung verwendeten Antikörper monoklonale Antikörper sind.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung wiederholt hergestellt wird und bestimmt ist für die

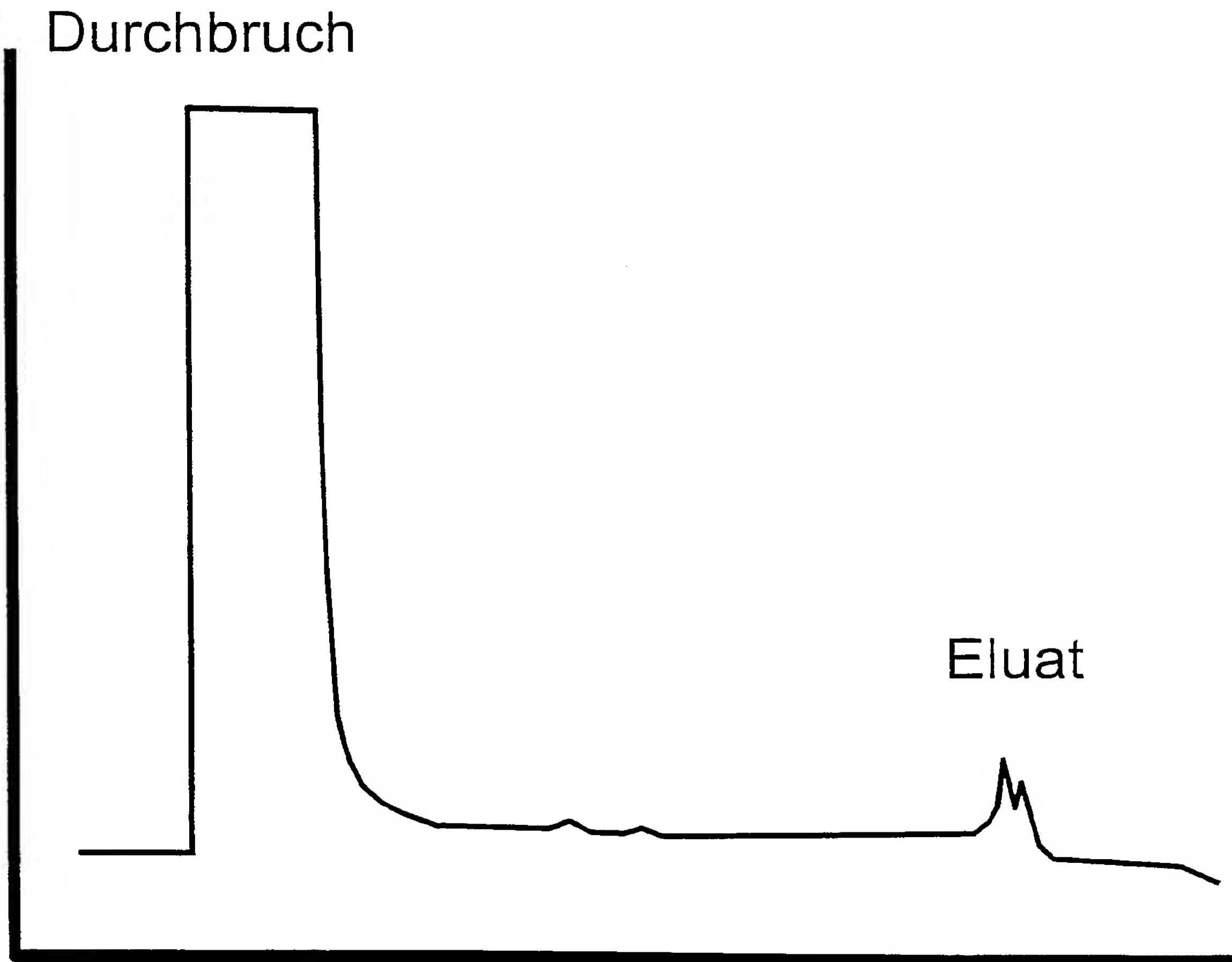
nachfolgende, in geeigneten Abständen wiederholte Verabreichung als individueller Impfstoff.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei es sich bei den Tumor-assoziierten Antigenen um häufig exprimierte und/oder co-exprimierte membranständige Moleküle auf Krebszellen epithelialen Ursprungs oder auf Krebszellen neuro-endokrinen Ursprungs oder auf Krebszellen des blutbildenden Systems handelt.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die immunaffinitätsgereinigten Antikörper oder deren Derivate zusammen mit einem geeigneten Vakzineadjuvans formuliert werden.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein Protein enthält, das die Immunantwort verstärkt und das gleichzeitig mit den Antikörpern verabreicht wird.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Protein ein humanes Protein ist.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei das humane Protein Granulozyten-Makrophagen stimulierenden Faktor (GM-CSF) ist.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Zusammensetzung geeignet ist für die Verabreichung der immunaffinitätsgereinigten Antikörper als Impfstoff durch subkutane oder intramuskuläre Injektionen.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die in der Zusammensetzung enthaltenen Antikörper mit einem Adjuvans gemischt und einer Hitzebehandlung unterworfen werden.
15. Verwendung von isolierten ex-vivo kultivierten dendritischen Zellen eines Individuums zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung geeignet als Impfstoff zur therapeutischen oder prophylaktischen Impfung

gegen Krebs, wobei die dendritischen Zellen mit Antikörpern zuvor in-vitro inkubiert wurden, welche aus einer Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeit desselben Individuums durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assozierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.

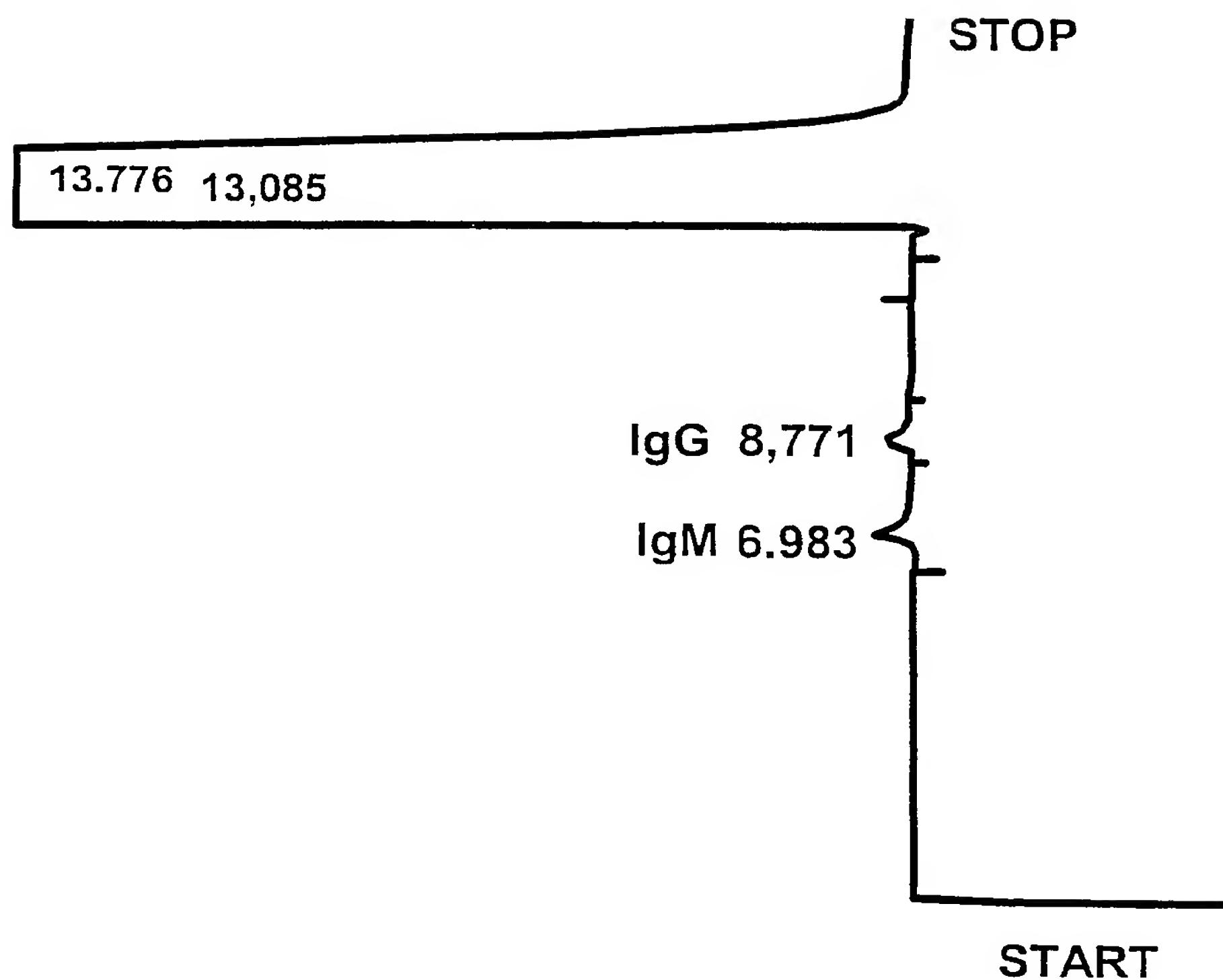
16. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend Antikörper, die aus Antikörper enthaltend Körperflüssigkeiten durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assozierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend isolierte, ex-vivo kultivierte Zellen eines Individuums, wobei die dendritischen Zellen zuvor mit Antikörpern in-vitro inkubiert wurden, welche aus einer Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeit desselben Individuums durch Immunaffinitätsreinigung gewonnen wurden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assozierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.
18. Verfahren zur Herstellung einer Antikörperpräparation dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Antikörper enthaltenden Körperflüssigkeit durch Immunaffinitätsreinigung Antikörper gewonnen werden, wobei als Liganden für die Immunaffinitätsreinigung Antikörper verwendet werden, die ein oder mehrere Tumor-assozierte Antigene erkennen, oder deren Fragmente mit gleichem Idiotyp.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei für die Affinitätsreinigung gleichzeitig mehrere Antikörper gegen verschiedene Tumor-assozierte Antigene und/oder Epitope solcher Antigene verwendet werden.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei die für die Affinitätsreinigung verwendeten Antikörper monoklonale Antikörper sind.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Körperflüssigkeit Serum ist.
22. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß eine Antikörperpräparation nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21 hergestellt wird und die so erhaltene Antikörperpräparation anschließend mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einem geeigneten Vakzineadjuvans formuliert wird.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Antikörperpräparation mit einem Adjuvans gemischt und anschließend einer Hitzebehandlung unterworfen wird.



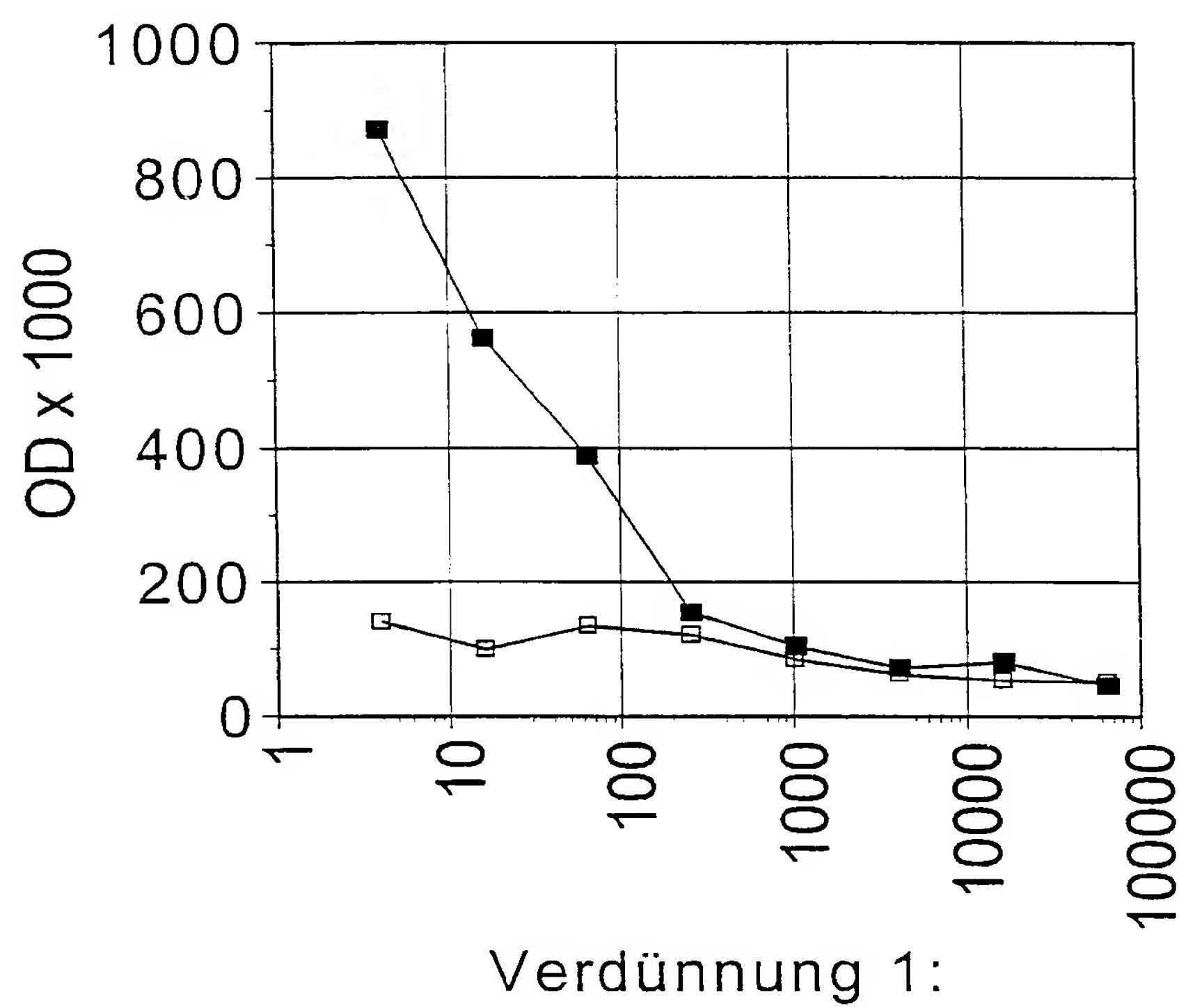
**Figur 1**

2/6



**Figur 2**

3/6

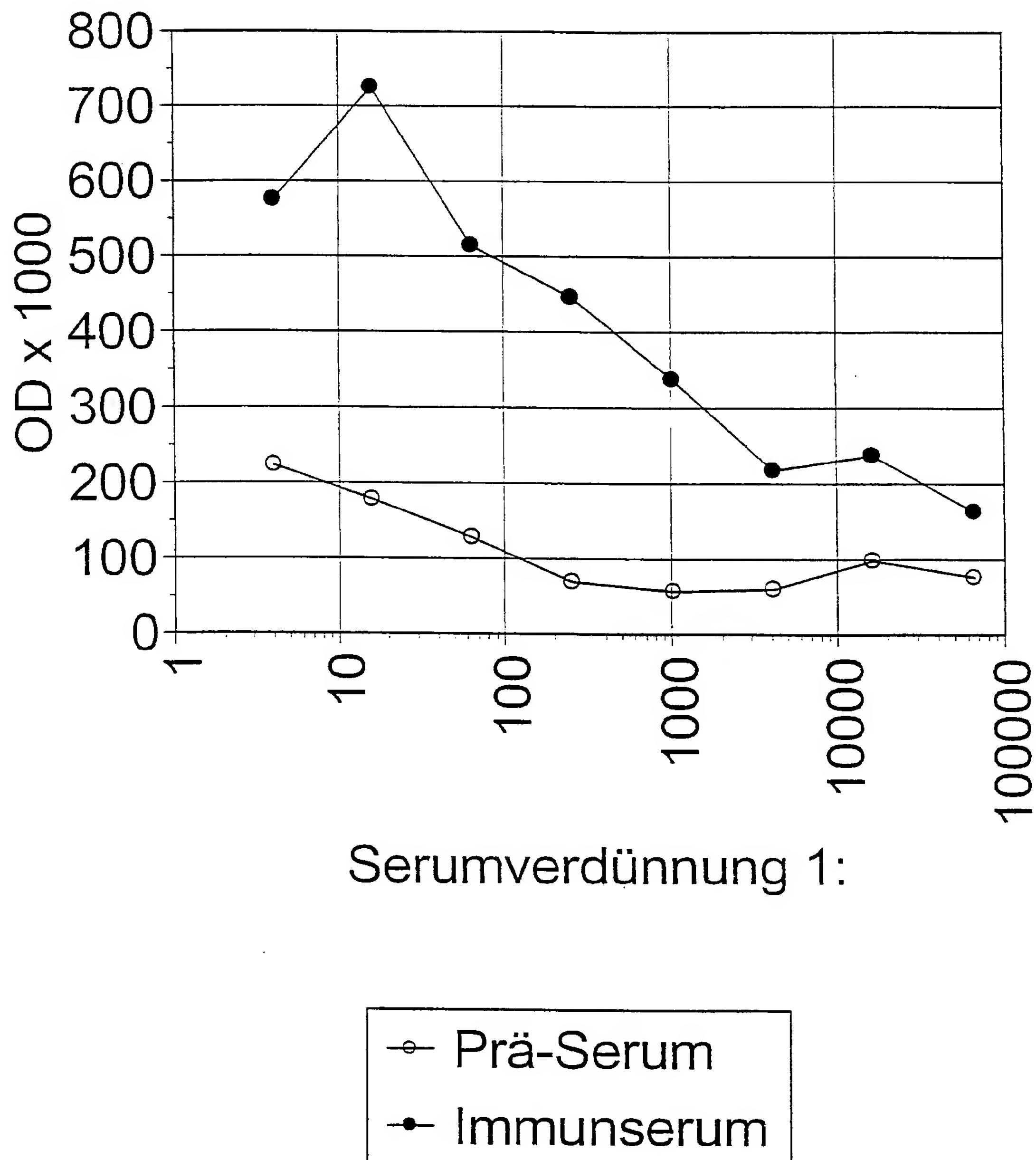


Verdünnung 1:

Normal Human Ig  
Affinitätsgereinigte  
Antikörper

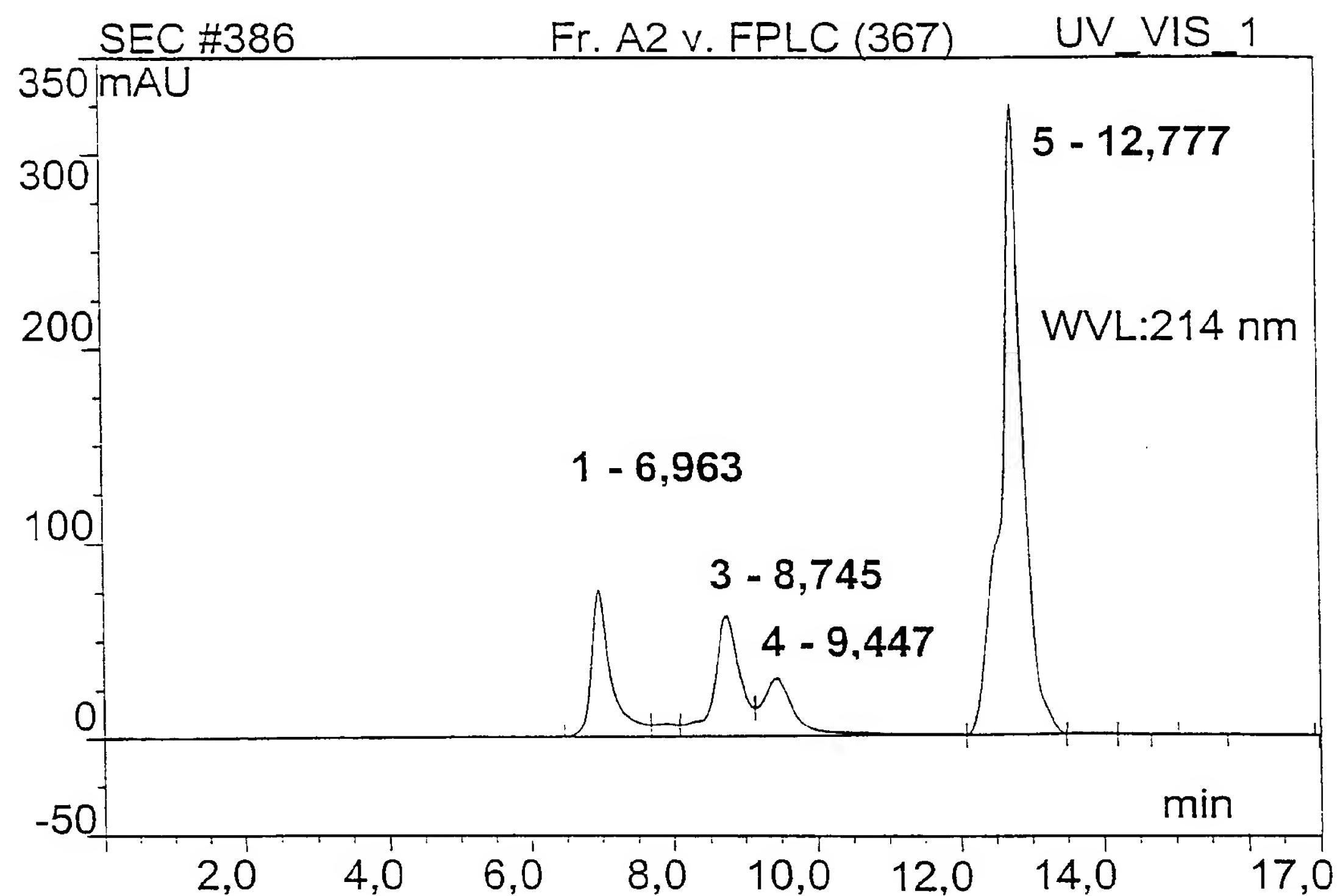
**Figur 3**

4/6

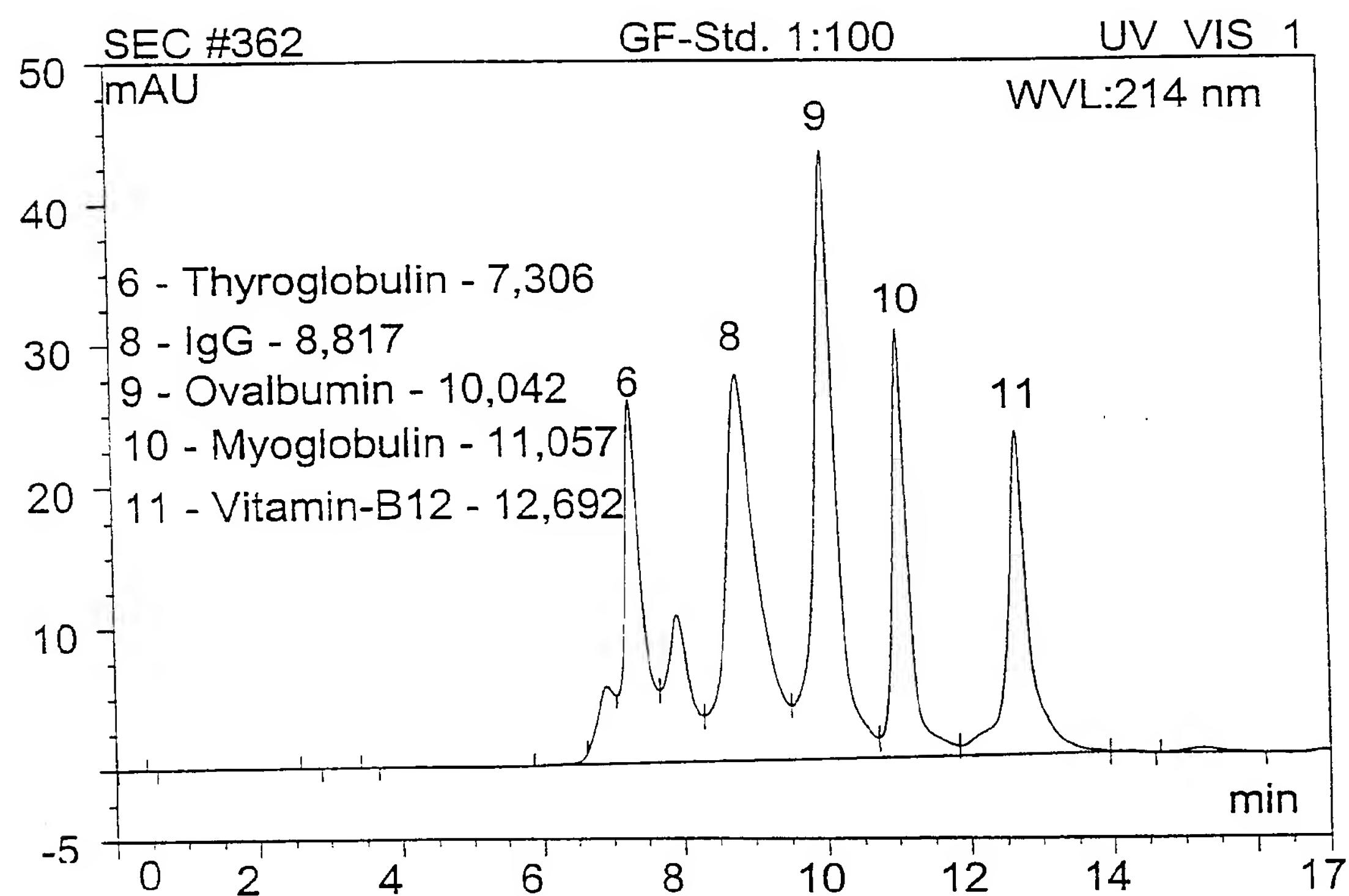


Figur 4

5/6

**Figur 5**

6/6

**Figur 6**